

Document made available under the Patent Cooperation Treaty (PCT)

International application number: PCT/JP05/001814

International filing date: 08 February 2005 (08.02.2005)

Document type: Certified copy of priority document

Document details: Country/Office: JP
Number: 2004-053882
Filing date: 27 February 2004 (27.02.2004)

Date of receipt at the International Bureau: 07 April 2005 (07.04.2005)

Remark: Priority document submitted or transmitted to the International Bureau in compliance with Rule 17.1(a) or (b)



World Intellectual Property Organization (WIPO) - Geneva, Switzerland
Organisation Mondiale de la Propriété Intellectuelle (OMPI) - Genève, Suisse

14.02.2005

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日
Date of Application: 2 0 0 4 年 2 月 2 7 日

出 願 番 号
Application Number: 特 願 2 0 0 4 - 0 5 3 8 8 2
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 4 - 0 5 3 8 8 2]

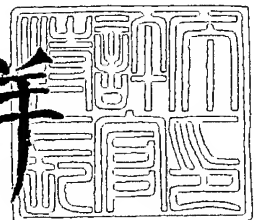
出 願 人
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

2 0 0 5 年 3 月 2 5 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

小 川

洋



【書類名】 特許願
【整理番号】 2004TE0227
【あて先】 特許庁長官殿
【国際特許分類】 C12N 15/04
C12N 15/09
C12N 15/31

【発明者】
【住所又は居所】 熊本県菊池郡西合志町須屋 1 6 3 5 番地 2 6 1
【氏名】 牛島 稔大

【発明者】
【住所又は居所】 熊本県熊本市八景水谷 3 丁目 6 番 8 9 - 1 号
【氏名】 坂口 正士

【発明者】
【住所又は居所】 熊本県熊本市池田 1 丁目 3 5 番 3 - 6 0 7 号
【氏名】 徳永 英治

【特許出願人】
【識別番号】 000173555
【氏名又は名称】 財団法人化学及血清療法研究所
【代表者】 内野 矜自

【手数料の表示】
【予納台帳番号】 056568
【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】
【物件名】 特許請求の範囲 1
【物件名】 明細書 1
【物件名】 図面 1
【物件名】 要約書 1

【書類名】 特許請求の範囲**【請求項 1】**

免疫原性を有する豚丹毒菌表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA 蛋白を生産する方法であって、アミノ酸の置換を行うことにより、可溶性のSpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白を不溶性の封入体として発現させることを特徴とする前記方法。

【請求項 2】

アミノ酸の置換が、下記 (1) ~ (6) の何れか一つ又は二つ以上の組合せであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

【請求項 3】

アミノ酸の置換が、下記 (a) ないし (f) の何れかであることを特徴とする請求項 1 記載の方法。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項 4】

豚丹毒菌が、藤沢株、小金井株、多摩96株、SE-9株及び静岡63株からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 1 ないし 3 の何れか一項記載の方法。

【請求項 5】

SpaA又は Δ SpaA蛋白が、下記 (1) ~ (6) の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を除き、配列番号 2 で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする請求項 1 ないし 4 の何れか一項記載の方法。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

【請求項 6】

SpaA又は Δ SpaA蛋白が、下記 (a) ないし (f) の何れかのアミノ酸を除き、配列番号 2 で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする請求項 1 ないし 4 の何れか一項記載の方法。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換

(f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換

(g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項7】

免疫原性を有する豚丹毒菌表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白の製造方法であって、アミノ酸の置換を行うことにより、可溶性のSpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白を不溶性の封入体として発現させる工程を取り入れることを特徴とする前記製造方法。

【請求項8】

アミノ酸の置換が、下記(1)～(6)の何れか一つ又は二つ以上の組合せであることを特徴とする請求項7記載の製造方法。

(1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換

(2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸をグリシンに置換

(3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換

(4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換

(5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸をトレオニンに置換

(6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

【請求項9】

アミノ酸の置換が、下記(a)ないし(f)の何れかであることを特徴とする請求項7記載の製造方法。

(a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換

(b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換

(c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換

(d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

(e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換

(f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換

(g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項10】

豚丹毒菌が、藤沢株、小金井株、多摩96株、SE-9株及び静岡63株からなる群より選ばれることを特徴とする請求項7ないし9の何れか一項記載の製造方法。

【請求項11】

SpaA又は Δ SpaA蛋白が、下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を除き、配列番号2で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする請求項7ないし10の何れか一項記載の製造方法。

(1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換

(2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸をグリシンに置換

(3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換

(4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換

(5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸をトレオニンに置換

(6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

【請求項12】

SpaA又は Δ SpaA蛋白が、下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を除き、配列番号2で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする請求項7ないし10の何れか一項記載の製造方法。

(a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換

(b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換

- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項 13】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白であって、下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記蛋白。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項 14】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白であって、下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記蛋白。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項 15】

豚丹毒菌が、藤沢株、小金井株、多摩96株、SE-9株及び静岡63株からなる群より選ばれることを特徴とする請求項13又は14の何れか一項記載の蛋白。

【請求項 16】

下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を除く他のアミノ酸配列が、配列番号2で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする請求項13又は15の何れか一項記載の蛋白。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項 17】

下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を除く他のアミノ酸配列が、配列番号2で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする請求項14又は15の何れか一項記載の蛋白。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換

- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項 18】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白を主成分とする組成物であって、当該蛋白が下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記組成物。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項 19】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白を主成分とする組成物であって、当該蛋白が下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記組成物。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項 20】

豚丹毒菌が、藤沢株、小金井株、多摩96株、SE-9株及び静岡63株からなる群より選ばれることを特徴とする請求項18又は19の何れか一項記載の組成物。

【請求項 21】

SpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白が、下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を除き、配列番号2で示されるアミノ酸配列又はそのC末側を除去したアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項18又は20の何れか一項記載の組成物。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項 22】

SpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白が、下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を除き、配列番

号2で示されるアミノ酸配列又はそのC末側を除去したアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項19又は20の何れか一項記載の組成物。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項23】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子であって、当該蛋白が下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記遺伝子。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項24】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子であって、当該蛋白が下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記遺伝子。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項25】

豚丹毒菌が、藤沢株、小金井株、多摩96株、SE-9株及び静岡63株からなる群より選ばれることを特徴とする請求項23又は24の何れか一項記載の遺伝子。

【請求項26】

SpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白が、下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を除き、配列番号2で示されるアミノ酸配列又はそのC末側を除去したアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項23又は25の何れか一項記載の遺伝子。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン

(6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項 27】

SpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白が、下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を除き、配列番号2で示されるアミノ酸配列又はそのC末側を除去したアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項24又は25の何れか一項記載の遺伝子。

(a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換

(b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換

(c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換

(d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

(e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換

(f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換

(g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項 28】

菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有する豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はそのC末側を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子であって、下記(1)～(6)の何れか一つの塩基又は二つ以上の組合せからなる塩基を有し、当該塩基を除く他の塩基配列が配列番号1で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなる前記遺伝子。

(1) 配列番号1記載の塩基配列において第206番目の塩基がG

(2) 配列番号1記載の塩基配列において第461番目の塩基がG

(3) 配列番号1記載の塩基配列において第608番目の塩基がC

(4) 配列番号1記載の塩基配列において第642番目の塩基がG

(5) 配列番号1記載の塩基配列において第758番目の塩基がC

(6) 配列番号1記載の塩基配列において第833番目の塩基がG

【請求項 29】

菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有する豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はそのC末側を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子であって、下記(a)ないし(f)の何れかの塩基を有し、当該塩基を除く他の塩基配列が配列番号1で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなる前記遺伝子。

(a) 配列番号1記載の塩基配列において第206番目の塩基がG

(b) 配列番号1記載の塩基配列において第608番目の塩基がG

(c) 配列番号1記載の塩基配列において第642番目の塩基がG

(d) 配列番号1記載の塩基配列において第833番目の塩基がG

(e) 配列番号1記載の塩基配列において第461番目及び第608番目の塩基が各々G及びC

(f) 配列番号1記載の塩基配列において第642番目及び第758番目の塩基が各々G及びC

(g) 配列番号1記載の塩基配列において第206番目、第461番目及び第608番目の塩基が各々G、G及びC

【請求項 30】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白を豚丹毒ワクチンとして使用する方法であって、当該蛋白が下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記方法。

(1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン

(2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン

(3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン

(4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン

(5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン

(6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項 3 1】

豚丹毒菌の表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白を豚丹毒ワクチンとして使用する方法であって、当該蛋白が下記 (a) ないし (f) の何れかのアミノ酸を有し、菌体内で封入体を形成し、且つ免疫原性を有することを特徴とする前記方法。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【請求項 3 2】

豚丹毒菌が、藤沢株、小金井株、多摩96株、SE-9株及び静岡63株からなる群より選ばれることを特徴とする請求項 3 0 又は 3 1 の何れか一項記載の方法。

【請求項 3 3】

SpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白が、下記 (1) ~ (6) の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を除き、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列又はそのC末側を除去したアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 3 0 又は 3 2 の何れか一項記載の方法。

- (1) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸がグリシン
- (2) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸がグリシン
- (3) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸がトレオニン
- (4) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸がグルタミン
- (5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸がトレオニン
- (6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸がグリシン

【請求項 3 4】

SpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白が、下記 (a) ないし (f) の何れかのアミノ酸を除き、配列番号 2 で示されるアミノ酸配列又はそのC末側を除去したアミノ酸配列からなることを特徴とする請求項 3 1 又は 3 2 の何れか一項記載の方法。

- (a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- (f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- (g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

【書類名】明細書

【発明の名称】大腸菌における豚丹毒菌表層防御抗原の生産方法

【技術分野】

【0001】

本発明は、大腸菌 (*Escherichia coli*) を宿主とする豚丹毒菌の表層防御抗原 (surface protective antigen; 以下、「SpaA」と称することもある) 蛋白の生産方法に関する。更に、詳細には、SpaA蛋白のアミノ酸の一部を置換することにより、可溶性のSpaA蛋白を大腸菌体内に封入体として発現させる方法、当該方法を含むSpaA蛋白の製造方法及び当該製造方法により得られる組換えSpaA蛋白に関する。

【背景技術】

【0002】

豚丹毒は、豚丹毒菌 (*Erysipelothrix rhusiopathiae*) の感染によって起こる豚の病気で、感染豚は、急性の敗血症型、亜急性の蕁麻疹型、慢性型の心内膜炎及び関節炎などの症状を呈する。年間3,000頭前後の発生報告があり、畜産農家に大きな被害を与えている。豚丹毒菌は、豚以外にイノシシ、鯨類、鶏、七面鳥などの食用動物に対しても病原性を持ち、家畜伝染病予防法において監視伝染病の一つに指定されている。また、豚丹毒は、人に類丹毒を引き起こす人獣共通伝染病でもあり、食肉衛生上からも重要視される疾病である。豚丹毒菌には多くの血清型が存在するが、豚の豚丹毒の発生のほとんどは1型菌又は2型菌によるもので、急性型は1型菌、蕁麻疹型及び慢性型は2型菌によるものが主体である。

【0003】

これまで、豚丹毒感染症を予防する方法として、弱毒生ワクチン (強毒株をアクリフラビン添加培地中で長期継代培養して作製した豚丹毒菌弱毒株Koganei株を用いて製造した凍結乾燥生ワクチン)、不活化ワクチン (豚丹毒菌強毒株の培養菌液をホルマリンで殺菌処理し、その全菌体及び菌体外生産物を水酸化アルミニウムゲルに吸着させて製造したバクテリアワクチン) 及び成分ワクチン (全菌体からアルカリ水溶液で抽出した菌体表層非精製蛋白質画分から成る成分ワクチン) が広く使用されている。弱毒生ワクチンは、少量を1回接種するだけその効果が現れ、経済的と考えられるが、これを使用した場合、問題点として、マウスに関節炎発症の病原性をもつこと、抗体の低い豚やSPF豚において重篤な副作用を示すこと、また慢性豚丹毒症例豚の病変からワクチン株が分離されることが指摘されている。

【0004】

新しいタイプのワクチンとして、遺伝子組換え技術による組換えワクチンの研究・開発も進められている。GalanとTimonyは、豚丹毒菌ゲノムの一部の遺伝子を発現する組換えファージを感染させた大腸菌の溶解物を用いてマウスを免疫した後、豚丹毒菌で攻撃試験を行ったところ、その14~17%が感染死から免れることを観察した。更に、同溶解物に対する免疫血清との反応性から当該遺伝子にコードされる蛋白が、分子量66、54、43 kDaの蛋白質であることを明らかにし、これらが豚丹毒菌の感染に対する感染防御抗原となり得ることを示した (例えば、非特許文献1参照)。

【0005】

Makinoらは、2型菌豚丹毒菌多摩96株の分子量64 kDaの表面蛋白質 (SpaAと命名) をコードする遺伝子が大腸菌で発現させ、得られた組換え大腸菌の生菌をマウスに免疫した後豚丹毒菌による攻撃試験を行い、SPA蛋白が感染防御能を有することを示した。また、彼等は、当該SPA蛋白は、606個のアミノ酸配列からなる蛋白で、そのN末側に29個のアミノ酸からなるシグナルペプチド、C末側に20個のアミノ酸からなる8個の相似な繰り返し配列 (8番目の繰り返し配列は、19個のアミノ酸からなる) を有することを明らかにした (例えば、非特許文献2参照)。

【0006】

Imadaらは、前記SPA蛋白に相当する1型菌藤沢株のSPA蛋白及びこれをコードする遺伝子を調べ、これが分子量69 kDa、626個のアミノ酸からなること、そのアミノ酸配列は、

2型菌のSPA蛋白に比べ、C末側の繰り返し配列が1個多い、9個の相似な繰り返し配列（9番目の繰り返し配列は、19個のアミノ酸からなる）を有することを明らかにし、全長SPA、C末の繰り返し領域を除いたSPA、又はN末側の一部及びC末側の繰り返し部分を除いたSPAとヒスチジンヘキサマーとの融合蛋白質が感染防御効果を有することを示した（例えば、非特許文献3、4参照）。

【0007】

渡辺らも、同様に、豚丹毒菌のSpaA蛋白からC末側の繰り返し配列及びN末側の分泌シグナルを除去した46.5 kDaのポリペプチドが感染防御抗原（46.5kDa protective antigen；46.5 KPAと命名）となり得ることを報告している（例えば、特許文献1参照）。

【0008】

一方で、ワクチン候補蛋白の生産性を上げる試みも行われている。例えば、ブレヴィバチルス・チョウシネンシスを宿主菌として46.5 KPAを菌体外に分泌発現させることに成功したとの報告がある（例えば、特許文献2参照）。この発現システムでは、発現量の約50%が培養液中で凝集して不溶性となる。本報告では、この不溶化した46.5 KPAの精製は、培養液を限外濾過膜でろ過し、膜上に回収された不溶物をアルカリ溶液に懸濁し、可溶化してくる46.5 KPAを回収する方法により行われている。すなわち、本法によれば、1）中性から弱アルカリ（pH7～9.5）条件下での限外濾過による濃縮工程、2）強アルカリ（pH10.0～12.0）条件下での限外濾過による濾過画分への回収工程、3）限外濾過画分の陰イオン交換クロマトグラフィーによる精製工程、の少なくとも3工程が必須である。

【0009】

SpaA遺伝子が大腸菌で発現させた場合、そのほとんどが可溶性の蛋白として発現されるので上記のような不溶物に対する精製方法を適用することができない。培養物には、目的のSpaA蛋白以外に大腸菌菌体、培地由来の成分や培養時に生産される代謝産物を初めとする多種多様の夾雑物質が混在する。このような混在物から目的とする可溶性のSpaA蛋白を効率的に回収精製することは容易ではない。一般に、動物用ワクチンは、人用ワクチンとは異なり、高純度、高品質に加えて、低価格でなければ畜産農家にとって受け入れ難い。したがって、動物用ワクチン製造メーカーには、常に、大量処理でき且つ製造コストを抑えた生産方法、回収精製方法の改善・改良が求められる。

【0010】

【特許文献1】特開2000-279179号公報

【0011】

【特許文献2】特開2002-34568号公報

【非特許文献1】Garan, J. E. et al. (1990) Infect. Immun., 58, 3116-3121

【非特許文献2】Makino, S. et al. (1998) Microb. Pathog. 25, 101-109

【非特許文献3】Imada, Y. et al. (1999) Proc. Jpn. Pig. Vet. Soc. 34, 12-

【非特許文献4】Imada, Y. et al. (1999) Infect. Immun. 67 (9), 4376-4382

【発明の開示】

【発明が解決しようとする課題】

【0012】

上述したように、大腸菌やブレヴィバチルス・チョウシネンシスを宿主として豚丹毒菌のSpaA遺伝子を発現させた場合、可溶性のSpaA蛋白あるいは可溶性蛋白と不溶性蛋白の混在する形で生産されるので製造方法が煩雑となり、高収率が期待できない。これは製造コストに反映する。

本発明は、このような技術上ないし工業上の必要性に鑑みてなされたものであって、SpaA遺伝子又はその一部を除去した短縮形のSpaA（以下、短縮形のSpaAを「 Δ SpaA」と称することもある）蛋白のアミノ酸配列の一部を置換することにより、可溶性のSpaA（又は Δ SpaA）蛋白を大腸菌体内に封入体として発現させ、これを回収精製することからなるSpaA（又は Δ SpaA）蛋白の製造方法を提供することを目的とする。

【0013】

また、本発明の他の目的は、上記方法により得られる高純度の組換えSpaA（又は Δ SpaA

）蛋白を提供することにある。

【課題を解決するための手段】

【0014】

本発明者らは、上記の目的を達成する為に鋭意研究を重ねた結果、SpaA（又は Δ SpaA）蛋白を発現させた大腸菌の中に不溶性の封入体を形成するクローンが混在すること、これらのSpaA（又は Δ SpaA）蛋白のアミノ酸配列の特定位置に置換が起こっていること、人為的にこのアミノ酸置換を行うことにより、可溶性のSpaA（又は Δ SpaA）蛋白は菌体内に封入体として蓄積されることを発見した。更に、これらのSpaA（又は Δ SpaA）蛋白は、封入体形成後も免疫原性を有することを見出し、本発明を完成するに至った。例えば、SE-9株由来のSpaA（又は Δ SpaA）蛋白の第69番目のアミノ酸をグリシンに置換、第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換、第278番目のアミノ酸をグリシンに置換、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換、第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換、第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換することにより、封入体が形成される。

【0015】

本発明は、以下に示す豚丹毒菌表層防御抗原SpaA（又は Δ SpaA）蛋白の生産方法を提供するものである。

1. 免疫原性を有する豚丹毒菌表層防御抗原SpaA蛋白又はその一部を除去した短縮型の Δ SpaA蛋白を生産する方法であって、アミノ酸の置換を行うことにより、可溶性のSpaA蛋白又は Δ SpaA蛋白を不溶性の封入体として発現させることを特徴とする前記方法。

2. アミノ酸の置換が、下記（1）～（6）の何れか一つ又は二つ以上の組合せであることを特徴とする上記1の方法。

- （1）シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- （2）シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸をグリシンに置換
- （3）シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- （4）シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- （5）シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- （6）シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

3. アミノ酸の置換が、下記（a）ないし（f）の何れかであることを特徴とする上記1の方法。

- （a）シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- （b）シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- （c）シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- （d）シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
- （e）シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
- （f）シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
- （g）シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

4. 豚丹毒菌が、藤沢株、小金井株、多摩96株、SE-9株及び静岡63株からなる群より選ばれることを特徴とする上記1ないし3の何れか一項記載の方法。

5. SpaA又は Δ SpaA蛋白が、下記（1）～（6）の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸を除き、配列番号2で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする上記1ないし4の何れか一項記載の方法。

- （1）シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- （2）シグナルペプチドを含むN末端より第154番目のアミノ酸をグリシンに置換
- （3）シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- （4）シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換

(5) シグナルペプチドを含むN末端より第253番目のアミノ酸をトレオニンに置換
(6) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
6. SpaA又は Δ SpaA蛋白が、下記(a)ないし(f)の何れかのアミノ酸を除き、配列番号2で示される配列又はそのC末側を除去した配列からなることを特徴とする上記1ないし4の何れか一項記載の方法。

(a) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
(b) シグナルペプチドを含むN末端より第203番目のアミノ酸をグルタミンに置換
(c) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
(d) シグナルペプチドを含むN末端より第278番目のアミノ酸をグリシンに置換
(e) シグナルペプチドを含むN末端より第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン及びトレオニンに置換
(f) シグナルペプチドを含むN末端より第214番目及び第253番目のアミノ酸を各々グルタミン及びトレオニンに置換
(g) シグナルペプチドを含むN末端より第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸を各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換

また、本発明は、上記1ないし7の何れか一項記載の方法を取り入れることを特徴とする豚丹毒菌表層防御抗原SpaA(又は Δ SpaA)蛋白の製造方法、当該製造方法により得られる豚丹毒菌表層防御抗原SpaA(又は Δ SpaA)蛋白及びこれを主成分とする組成物、当該蛋白を豚丹毒ワクチンとして使用する方法及び当該蛋白をコードする遺伝子を提供するものである。

【発明の効果】

【0016】

本発明の方法によれば、大腸菌に可溶性のSpaA(又は Δ SpaA)を不溶性の封入体として発現させる方法が提供される。大腸菌体内に封入体として発現させることにより、遠心分離・洗浄操作を行うだけでSpaA(又は Δ SpaA)を容易に高純度に精製できる。こうして得られるSpaA(又は Δ SpaA)封入体は、可溶化後、希釈するだけでワクチンとして使用可能な純度及び免疫原性を有する。すなわち、簡便且つ効果的なSpaA(又は Δ SpaA)ワクチンの製造方法が提供される。当該方法により得られるSpaA(又は Δ SpaA)を用いれば、これまで行われてきた豚丹毒菌を出発材料とする不活化ワクチンや成分ワクチンの製造方法に比べて、豚丹毒菌の人への感染機会を低減することができる。また、豚丹毒弱毒菌に見られる病原性の復帰、抗体の低い豚やSPF豚に対する重篤な副作用などの問題が回避される。

【発明を実施するための最良の形態】

【0017】

本発明の方法は、SpaA(又は Δ SpaA)蛋白のアミノ酸配列の特定位置のアミノ酸を特定のアミノ酸に置換することにより当該蛋白を大腸菌体内に封入体として発現させる方法、及び当該方法を組み入れたSpaA(又は Δ SpaA)蛋白の製造方法によって特徴付けられる。

(1) SpaA(又は Δ SpaA)遺伝子のクローニング

豚丹毒菌には、豚に病原性の強いものとして主に2種類の血清型が存在し、1型菌と2型菌に分類される。1型菌として藤沢株、小金井株、2型菌として多摩96株、SE-9株、静岡63株などが挙げられるが、何れの菌株由来のSpaA遺伝子も本発明に使用できる。これらの菌体の増殖は、市販の培地を用いて、添付の方法に従って行われる。例えば、一定量の菌体を0.1%Tween80添加ブレインハートインフュージョン培地に懸濁し、37℃で、16~48時間培養する方法が取られる。

【0018】

SpaA(又は Δ SpaA)蛋白をコードする遺伝子は、非特許文献4記載の配列(配列番号1)を下に設計したPCRプライマーを用い、上記の菌体から抽出したDNAを鋳型としてPCRを行うことにより取得できる。配列番号1は、藤沢株由来SpaA遺伝子の全塩基配列、配列番号2は、藤沢株由来のシグナルペプチドを含む全長SpaA蛋白のアミノ酸配列を示す。また、配列番号7は、SE-9株由来SpaA遺伝子の全塩基配列の一部を示す。この配列は、配列番号

1 の配列の107番目～34番目に相当する。鋳型DNAの調製は、市販のDNA抽出キット、例えば、Isoplant（株式会社ニッポンジーン）を用い、添付のプロトコールに従って行われる。PCRプライマーは、DNA合成受託機関（例えばQIAGEN社）などに依頼すれば容易に入手可能である。この時、5'側に適当な制限酵素切断部位の配列を付加することが望ましい。より具体的には、配列番号3にNcoIサイト、配列番号4及び5にBamHIサイトを付加した合成DNAが使用される。SpaA蛋白をコードするDNA断片の増幅には、配列番号3及び5記載のプライマー、 Δ SpaA蛋白をコードするDNA断片の増幅には、配列番号3及び4記載のプライマーが使用される。得られるSpaA及び Δ SpaA蛋白をコードするDNA断片は、制限酵素NcoIに由来するMetとシグナル配列のC末側3個のアミノ酸（Ala-Phe-Ala）をコードする12個の塩基が付加されたものとなる。 Δ SpaA蛋白をコードするDNA断片は、SpaA遺伝子の1260番目までの塩基を有する断片で、C末側のアミノ酸207個が除去された短縮形のSpaA蛋白をコードする。SpaA蛋白の一部を除去した Δ SpaA蛋白の部位及びサイズは、プライマー配列の位置を変えることにより、目的に応じ任意に設定できる。PCR反応は、市販のLA-Taqキット（宝酒造）、Advantage HF-2 PCR Kit (BC Bioscience)等を用い、添付のプロトコールに従って行えば良い。PCRにより得られるDNA断片の塩基配列は、TAクローニングキット（インビトロジェン社）等を用いてクローニングした後、DNAシーケンサー、例えば、ABI PRISM310 Genetic Analyzer（PEバイオシステムズ社）により決定される。

【0019】

こうして得られるSpaA（又は Δ SpaA）蛋白をコードする遺伝子のクローニングが行われる。より具体的には、前記のPCR産物を、NcoI及びBamHI制限酵素で消化した後、予め同じ制限酵素で消化した適当なプラスミド、例えば、pET11d（Novagen社）に挿入し、大腸菌に導入する。大腸菌コロニーの中から目的の蛋白をコードするDNAを有するクローンを選択する。宿主大腸菌として、HB101、JM109、LE392、TB1及びBL21などが使用可能であるが、好ましくは、JM109である。遺伝子の導入方法としては、エレクトロポレーション法、プロトプラスト法、PEG法などが挙げられるが何れの方法を用いても良い。目的遺伝子の確認は、プラスミドを精製し、塩基配列を決定することにより行われる。このような一連の組換え操作は、Sambrookらが述べている一般的な遺伝子組換え技術（Molecular Cloning, A Laboratory Manual Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y., 1989）に従って行うことができる。実際には、市販のキットを用い、添付の方法に従って行えば良い。

【0020】

（2）不溶性SpaA（又は Δ SpaA）蛋白の発現及び精製

クローニングされたSpaA（又は Δ SpaA）遺伝子の特定部位に、ポイントミューテーションを入れ、これを大腸菌に導入することにより、本来、可溶性であったSpaA（又は Δ SpaA）蛋白を不溶性の封入体として発現させることができる。

【0021】

ポイントミューテーションは、サイトダイレクティドミュータジェネシス法により行われる。実際には、Takara社のSite-Directed Mutagenesis System（Mutan-Super Express Km、Mutan-Express Km、Mutan-Kなど）、Stratagene社のQuickChange Multi Site-Directed Mutagenesis Kit、QuickChange XL Site-Directed Mutagenesis Kit、Invitrogen社のGeneTailor Site-Directed Mutagenesis Systemなどの市販のキットを用い、添付のプロトコールに従えば良い。既にポイントミューテーションが入った適当サイズの核酸断片を置換することにより、ポイントミューテーションを入れることもできる。

また、通常のPCRを行った場合、増幅遺伝子には、不特定の位置に不特定の数の塩基置換が一定の割合で生じるので、この方法を利用することにより塩基置換を行うことができる。置換された塩基がアミノ酸コドンに影響する場合、アミノ酸変異を起こすことになり、その結果、封入体を形成するクローンが出現する。これらのクローンを選択することにより封入体を得ることができる。

【0022】

可溶性のSpaA（又は Δ SpaA）蛋白は、当該蛋白の第69番目のアミノ酸をグリシンに置換

、第154番目のアミノ酸をグリシンに置換、第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換、第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換、第278番目のアミノ酸をグリシンに置換することにより、大腸菌体内で不溶性の封入体として発現される。したがって、SpaA遺伝子のポイントミューテーションは、これらのアミノ酸が置換されるように行われる。上記の少なくとも一箇所にアミノ酸変異を入れることにより封入体は形成されるが、免疫原性を消失しない限り、全てに変異を入れても良い。好ましくは、SpaA（又は Δ SpaA）蛋白の第69番目のアミノ酸がグリシンに置換、第214番目のアミノ酸がグルタミンに置換、第278番目のアミノ酸がグリシンに置換、第154番目及び第203番目のアミノ酸が各々グリシン及びトレオニンに置換、第214番目及び第253番目のアミノ酸が各々グルタミン及びトレオニンに置換、第69番目、第154番目及び第203番目のアミノ酸が各々グリシン、グリシン及びトレオニンに置換されるようにSpaA遺伝子のポイントミューテーションが行われる。SpaA蛋白の一部を除去して得られる Δ SpaA蛋白の領域及びサイズは、免疫原性を保持し、且つアミノ酸置換をしたときに封入体を形成する範囲であれば特に制限されない。少なくともC末側の約1/3を除去した Δ SpaAは、本発明に使用することができる。好ましくは、C末側207個のアミノ酸を除去した、シグナルペプチドを含むN末側より420個のアミノ酸からなる Δ SpaA蛋白である。上記と逆のアミノ酸置換を行うことにより、不溶性のSpaA（又は Δ SpaA）蛋白を可溶性のSpaA（又は Δ SpaA）にすることも可能である。このように本発明の方法により、目的に応じて可溶性又は不溶性のSpaA（又は Δ SpaA）蛋白を自由に得ることができる。

【0023】

ポイントミューテーションが施されたSpaA（又は Δ SpaA）遺伝子の発現は前記のクローニングに用いた方法に準じて行われる。発現ベクターは市販のものを使用し、これに合わせて適当な大腸菌が宿主として選択される。例えば、T7プロモーターを有するベクターの場合にはBL21（DE3）、DH5 α （DE3）、トリプトファンプロモーターを有するベクターの場合にはHB101、DH5 α 、JM109などが使用される。好ましくは、クローニングと目的蛋白の発現を同時に行うことができるpET11d（Novagen社）ベクターと大腸菌BL21株の組み合わせである。

【0024】

SpaA（又は Δ SpaA）蛋白を発現している組換え大腸菌のスクリーニングは、以下のように行われる。発現誘導剤（本発明に使用した発現システムではIPTGを使用）の存在下に、培養・増殖した菌体を低速遠心分離により回収し、これに一定の蒸留水を加え懸濁した後、超音波処理、又はフレンチプレス、マントングリン等のホモジナイザーにより菌体を破碎し、高速遠心（15000 rpm、15分間）により沈渣に封入体を回収する。蒸留水に、適宜界面活性剤（例えば、Triton X100）、キレート剤（例えば、EDTA）、リゾチーム等を添加しても良い。再度、適当量の蒸留水に懸濁した後、一定量をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけ、クマシーブリリアントブルーで染色した後、分子サイズ及び染色像からSpaA（又は Δ SpaA）蛋白の発現を確認する。また、封入体の形成量は、上記の遠心分離後の上清と沈渣のSpaA（又は Δ SpaA）蛋白量を比較することにより行われる。本発明においては、約90%以上が沈渣に検出される。SpaA（又は Δ SpaA）蛋白の確認（または検出）には、上記の分子サイズに基づく方法以外に、ELISA法、ウェスタンブロット法、ドットブロット法などの抗原抗体反応に基づく方法が取られることもある。いずれも大腸菌で発現させた外来蛋白を検出する際の一般的な方法であり、目的に応じて適宜選択すればよい。

【0025】

斯かるSpaA（又は Δ SpaA）蛋白産生大腸菌からSpaA（又は Δ SpaA）蛋白を精製する際には、特許文献2に記載の方法、あるいは、一般的に、蛋白質化学において使用される精製方法、例えば、遠心分離、塩析法、限外ろ過法、等電点沈殿法、電気泳動法、イオン交換クロマト法、ゲルろ過クロマト法、アフィニティークロマト法、疎水クロマト法、ハイドロキシアパタイトクロマト法などの方法を組み合わせた方法が使用される。本発明の方法に従えば、SpaA（又は Δ SpaA）蛋白産生大腸菌の培養菌液を酵素処理（例えば、リゾチー

ム)、超音波処理(例えば、音波照射型細胞破碎機)又は両処理を行った後、遠心分離(例えば、15000 rpm、15分間)と洗浄バッファー(例えば、20mM Tris-HCl pH7.5, 10mM EDTA, 1% TritonX-100)への懸濁を繰り返すことにより、90%以上の精製が可能である。

【0026】

(3) SpaA (又はΔSpaA) 蛋白の免疫原性

こうして得られるSpaA (又はΔSpaA) 蛋白の免疫原性は、これらの蛋白をマウス又はその他の感染動物に免疫し、豚丹毒菌の強毒株で攻撃試験を行うことにより調べることができる。免疫方法(例えば、皮下、筋肉内、腹腔内等の投与部位、免疫期間等)は、通常ワクチン等の免疫原性を調べる時に使用される一般的な手法に従えば良い。より具体的には、抗原蛋白を25% (vol/Vol) 水酸化アルミニウムゲル加生理食塩水で5倍階段希釈した希釈列を調整し、1希釈列あたり5~10匹のマウス(ddy、5週齢、♀)皮下投与して免疫する。免疫の3週間後に豚丹毒菌の強毒株である藤沢株の生菌をマウス皮内に注射し、10日間、マウスの生死を観察する。抗原蛋白の免疫効果は、その蛋白の半数防御量(PD50)を以て判定する。

【0027】

本発明のSpaA (又はΔSpaA) 蛋白は、メンブランフィルター等で無菌ろ過し、豚丹毒菌及びその他の感受性動物、例えば、イノシシ、鯨類、鶏、七面鳥及びヒトへの感染を防御するためのワクチン原料として使用される。これに、水酸化アルミニウム、リン酸アルミニウム、ミネラルオイル及びノンミネラルオイル等の免疫賦活剤、ポリソルベート80、アミノ酸及びラクトースやスクロース等の糖等の安定剤及びホルマリン、チメロサル、2-フェノキシエタノール、ベンジルアルコール、塩化ベンゼトニウム及び塩化ベンザルコニウム等の保存剤を適宜選択して添加することにより製剤化が行われる。また、賦形剤としての効果を有するラクトース、スクロース等の糖を添加した場合、凍結乾燥製剤として製剤化することも可能である。

以下に、実施例を挙げて本願発明をさらに具体的に説明するが、この例示に限定されるものではない。なお、以下に示す実施例では、特に断りのない限り、和光純薬、宝酒造、Difco社製の試薬を使用した。

【実施例1】

【0028】

(1) SpaA及びΔSpaAをコードする遺伝子のクローニング

豚丹毒菌血清型1型の藤沢株及び小金井株、血清型2型の多摩96株及びSE-9株を0.1% Tween 80添加ブレインハートインフュージョン培地(Difco)で37℃、16~48時間培養した。培養菌液(約1.5~3.0mL)を遠心して得られた沈殿(約0.03g以上)より、DNA抽出キット(Isoplant、株式会社ニッポンジーン)を用いて全ゲノムDNAを抽出した。

これを鋳型として、配列番号: 1記載の塩基配列に基づき作製した合成プライマー(配列番号3と4のペアー、3と5のペアー)とLA-Taキット(宝酒)を用いてPCRを行った。反応液を94℃に3分間保持した後、94℃-60秒、56℃-30秒、72℃-60秒のサイクルを30回繰り返した。配列番号3のプライマーは、SpaA遺伝子の第79番目の塩基より下流領域を増幅させるために設計したもので、その5'末側にNcoIサイトが付加されている。配列番号4及び5のプライマーは、それぞれSpaA遺伝子の第1260番目及び第1881番目の塩基(SpaA遺伝子の終止コドン)までを増幅させるために設計したもので、これらの5'末側にはBamHIサイトが付加されている。PCRにより、第79~1881番目の塩基配列を有するSpaA遺伝子及び第79~1260番目の塩基配列を有するΔSpaA遺伝子を得られる。

PCRにより増幅したDNA断片をNcoI及びBamHIで2重消化し、得られる消化物と予めNcoI及びBamHIで2重消化したプラスミドpET11d(Novagen社)とをT4DNAリガーゼを用いて連結した。この反応液と大腸菌JM109を混合し、氷中に数十秒間放置した後、アンピシリン50μg/ml含有LB寒天培地(1.0% Tryptone、0.5% Yeast Extract、1.0% NaCl、1.5% 寒天、pH7.0)に塗布し、37℃で一晩放置した。シングルコロニーをアンピシリン50μg/ml含有LB培地1~5mLに接種し、30~37℃で振盪し、定法に従い菌体からSpaA及びΔSpaA蛋白をコードする遺伝子を有するプラスミドを抽出した(図1-a、図1-b)。

【0029】

(2) SpaA及びΔSpaA蛋白の発現

実施例1-(1)と同様の方法に従って、各菌株由来のプラスミドを大腸BL21(DE3)に導入し、形質転換したシングルコロニーを得た。シングルコロニーをアンピシリン50 μ g/ml含有LB培地1~5mLに接種し、30~37℃で振盪しながら、培養菌液のOD600nm値が0.6~1.0に達するまで培養した。この菌液に1/100容のIPTG(100mM)溶液を加え、更に37℃で2~3時間振盪培養した。当該培養液と等量の2xSDSサンプルバッファーを混合し、100℃で2分間加熱処理した後、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)にかけ、クマシーブリリアントブルー(ナカライテスク社製)で染色した。全ての菌株において70及び45kD付近のバンドが検出され、これらの染色像からSpaA及びΔSpaA蛋白の発現を確認した。図2は、SE-9株由来SpaA及びΔSpaA蛋白のSDS-PAGEの結果を示す。

【0030】

(3) SpaA及びΔSpaA蛋白の形状

SpaA及びΔSpaA蛋白の封入体形成の有無を以下の方法で調べた。実施例1-(2)の培養菌液を10000rpm、5分間遠心し、得られた沈渣に、もとの培養菌液量の1/5~1/10容の洗浄バッファー(20mMTris-HCl pH7.5, 10mMEDTA, 1%TritonX-100)あるいは蒸留水を加え、均一になるまで懸濁した。この懸濁液にリゾチーム溶液(10mg/ml)を1/100容量添加し、30℃、15分間感作した後、氷冷下、ハンディソーニケーター(メーカー; トミー精工、モデル; UR-20P、アウトプット; 5、時間; 15秒、2~4回)で超音波処理し、15000rpmで15分間遠心分離した。遠心上清を回収した後、その沈渣に遠心前の超音波処理液と等量の洗浄バッファーを加えて再び均一になるまで懸濁した。回収した遠心上清及び沈渣懸濁液のそれぞれに等量の2xSDSサンプルバッファーを加え加熱後、SDS-PAGEにかけ、クマシーブリリアントブルーで染色した。ΔSpaA蛋白が沈渣懸濁液に認められた場合、当該ΔSpaA蛋白は封入体を形成していると判定した(図3)。その結果、SE-9株の数クローンに封入体の形成が認められた(表1)。表1は、調べたクローン数に対する封入体形成クローン数を示す。なお、NDは、未実施を意味する。

【0031】

【表1】

	封入体形成菌/ΔSpaA発現菌	封入体形成/SpaA発現菌
藤沢株(1型菌)	0/3	ND
SE-9株(2型菌)	3/30	0/3
多摩-96株(2型菌)	0/3	ND
小金井株(1型菌)	0/3	ND

【0032】

(4) 封入体形成菌の塩基配列

次に、表1の封入体を形成したSE-9株3クローン(No1、No2及びNo3)よりプラスミドを抽出し、ΔSpaA蛋白をコードする遺伝子の塩基配列を解析した(タカラバイオカスタムサービスセンターに依頼)。配列番号7の配列と比較した結果、表2に示した塩基の変異によるアミノ酸置換が認められた。

【0033】

【表2】

第206番目	AがGに置換(第69番目のグルタミン酸がグリシンに置換)	No2
第461番目	AがGに置換(第154番目のグルタミン酸がグリシンに置換)	No2
第608番目	TがCに置換(第208番目のイソロイシンがトレオニンに置換)	No2
第642番目	TがGに置換(第214番目のヒスチジンがグルタミンに置換)	No1
第758番目	TがCに置換(第253番目のメチオニンがトレオニンに置換)	No1
第833番目	AがGに置換(第278番目のアスパラギン酸がグリシンに置換)	No3

【実施例2】

【0034】

(1) Δ SpaA蛋白のアミノ酸置換による発現蛋白の封入体化

実施例1-(4)の封入体形成菌由来のプラスミドを適当な制限酵素で切断して得られる表2の塩基置換を含むDNA断片を、可溶性の Δ SpaA蛋白を発現する菌体(SE-9株)より抽出したプラスミドの Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の相当する領域に置換挿入したプラスミドを構築した。より具体的には、

a) クローンNo1のプラスミドを制限酵素EcoRI及びClaIで二重消化し、アガロース電気泳動にかけ、 Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第587番目から1152番目を含むEcoRI-ClaI断片(図4-a)を分離・精製した。これを、予めEcoRI及びClaI処理した可溶性の Δ SpaA蛋白を発現する菌体(SE-9株)由来のプラスミドに挿入し、 Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第642番目及び第758番目の塩基が置換されたプラスミドを構築した。同様の手法により、

b) クローンNo3由来の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第587番目から1152番目を含むEcoRI-ClaI断片(図4-b)を挿入したプラスミド(第833番目の塩基置換)、

c) クローンNo2由来の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第266番目から1152番目を含むKpnI-ClaI断片(図4-c)を挿入したプラスミド(第461番目と第608番目の塩基置換)、及び

d) クローンNo2由来の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第587番目から1152番目を含むEcoRI-ClaI断片(図4-d)を挿入したプラスミド(第608番目の塩基置換)を構築した。

e) Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第206番目の塩基が置換されたプラスミドは、可溶性の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子(SE-9株由来)の第266番目から1152番目を含むKpnI-ClaI断片(図4-e)をKpnI及びClaI処理したクローンNo2由来のプラスミドに挿入することにより構築した。また、

f) Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第642番目の塩基が置換されたプラスミドは、サイトダイレクティドミュータジェネシス法(Takara, Mutan-Super Express Km)により構築した。より具体的には、可溶性の Δ SpaA蛋白を発現する菌体(SE-9株)由来のプラスミド(図1-b)を、EcoRI及びHindIIIで二重消化し、 Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第587番目から1260番目及びプラスミド(pET11d)の一部を含むEcoRI-HindIII断片(967bp)をベクタープラスミドpKF18k(Takara社)にクローニングした。これを鋳型として、配列番号6の変異導入用合成オリゴヌクレオチド(Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第642番目の塩基TをGに置換した第632番目から第657番目の配列を有する)、Takara社のMutan-Super Express Kmキットに添付のセレクションプライマー5pmol、10x LAPCRバッファ(+Mg²⁺) 5 μ l、dNTP混合液8 μ l、LA-Taqポリメラーゼ溶液0.5 μ l及び滅菌蒸留水を加え50 μ lとし、実施例1-(1)と同様にPCRを行った。このPCR反応液をエタノール沈殿/洗浄した後に大腸菌MV1184株(Takara社)にクローニングした。得られた変異導入プラスミドをEcoRI及びBamHIで二重消化し、 Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第587番目から1260番目を含むEcoRI-BamHI断片を分離・精製した。この断片を出発材料である可溶性の Δ SpaA蛋白を発現する菌体(SE-9株)由来のプラスミドの相同部分に置換挿入し、目的のプラスミドを得た。藤沢株、多摩96株由来の Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子についても、前記と同様の方法に従い、第642番目の塩基TがGに置換されたプラスミドを構築した。このようにして得られたプラスミドで大腸菌BL21(DE3)を形質転換し、実施例1-(3)に従って Δ SpaA蛋白の形状を調べた結果、何れのプラスミドで形質転換した場合も Δ SpaA蛋白は封入体を形成していた。

【0035】

(2) 全長SpaA蛋白のアミノ酸置換による発現蛋白の封入体化

実施例2-(1)-a)のプラスミドをPstI及びClaIで二重消化し、アガロース電気泳動にかけ、 Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子の第611番目から1152番目の配列を含むPstI-ClaI断片(図4-f)を分離・精製した。これを、予めPstI及びClaI処理した可溶性の全長SpaA蛋白を発現する菌体(SE-9株)由来のプラスミドに挿入し、SpaA蛋白をコードする遺

伝子の第642番目及び第758番目の塩基が置換されたプラスミドを構築した。このプラスミドで大腸菌BL21(DE3)株を形質転換し、実施例1-(3)に従って発現蛋白の形状を調べた結果、SpaA蛋白は封入体として発現された(図5)。

【実施例3】

【0036】

(1) 封入体を形成するSpaA (又は Δ SpaA) の精製
 実施例2-(1)で得た Δ SpaAを封入体として発現する大腸菌及び実施例2-(2)で得た全長SpaA蛋白を封入体として発現する大腸菌をそれぞれ培養し、各培養菌液100 mlを、10000rpm、5分間遠心し、得られた沈渣に、もとの培養菌液量の1/5~1/10容の洗浄バッファ(20mMTris-HCl pH7.5, 10mMEDTA, 1%TritonX-100)を加え、均一になるまで懸濁した。この懸濁液にリゾチーム溶液(10mg/ml)を1/100容量添加し、30℃、15分間静置した後、氷冷下、音波照射型細胞破碎機(メーカー; Branson Sonic Power Co.、モデル; 350、アウトプット; 4、Duty Cycle; 30%、時間5~15分)で超音波処理し、15000rpmで15分間遠心分離した。遠心上清を除去した後、その沈渣に遠心前の超音波処理液と等量の洗浄バッファ(又は滅菌蒸留水)を加えて再び均一になるまで懸濁した。この懸濁液を15000 rpmで15分間遠心分離し、遠心上清を除去して洗浄バッファ(又は滅菌蒸留水)を加えた。この遠心・洗浄操作を3~5回繰り返した。なお、洗浄の最終段階では遠心沈渣を滅菌蒸留水に懸濁した。この懸濁液を再び15000 rpmで15分間遠心分離し、遠心上清を除去した後、沈渣を8M尿素溶液10 mlに懸濁した。室温で2時間、さらに5℃で18時間穏やかに振騰を加えながら、封入体蛋白を可溶化したものを精製SpaA (又は Δ SpaA) 蛋白とした。SDS-PAGE後のゲルをクマシーブルー染色し、デンシトメーターで測定した結果、この操作により得られるSpaA及び Δ SpaA蛋白は、90%以上の純度を示した(図6)。

【0037】

(2) SpaA (又は Δ SpaA) 蛋白の免疫原性
 SpaA (又は Δ SpaA) の免疫原性を次のとおり確認した。実施例3-(1)で精製したSpaA (又は Δ SpaA) 溶液4 mlに、生理食塩水11 mlと水酸化アルミニウムゲルアジュバント (ALHYDROGEL"85", Superfos Biosector社) 5 mlを加え、室温で2時間穏やかに振騰し、ワクチン液とした。このワクチン液を25% (vol/Vol) 水酸化アルミニウムゲル加生理食塩水で5倍階段希釈した希釈列を調整し、1希釈列あたり10匹のマウス(ddy、5週齢、♀)皮下に0.5 ml注射して免疫した。免疫の3週間後に豚丹毒菌藤沢株の生菌約1000個をマウス皮内に注射して攻撃した。10日間マウスの生死を観察し、精製したSpaA (又は Δ SpaA) 蛋白の半数防御量(PD50)を求めた。表3に示したとおり、精製したSpaA又は Δ SpaA蛋白の半数防御量(PD50)は、0.0621 μ g/mL~0.1885 μ g/mLと、きわめて高い免疫原性を有していた。マウス半数防御量(50%有効量)は、Behrens-Karber法(Karber G: Beitrag zur kollektiven Behandlung pharmakologischer Reihenversuche. Arch Exp Path Pharm 162:480,1931.、細菌学実習提要 改訂5版 医科学研究所学友会編(丸善)、p564-565)により、次式のとおり計算した。

マウス半数防御量(μ g) = 10^m 、 $m = X_4 - [(h_0 + h_1)(X_1 - X_0)x_{1/2} + (h_1 + h_2)(X_2 - X_1)x_{1/2} + (h_2 + h_3)(X_3 - X_2)x_{1/2} + (h_3 + h_4)(X_4 - X_3)x_{1/2}]$

X_0, X_1, \dots, X_4 は各接種量の対数であり、 h_0, h_1, \dots, h_4 はそれに対する実測効果率(生存数/攻撃数)である。なお、各接種量の対数(X)は、 $X = \text{Log}_{10} [\text{試料の蛋白濃度} (\mu\text{g/ml}) \times \text{マウス注射量} (\text{ml}) \div \text{希釈倍数}]$ の式で与えられる。

【0038】

【表 3】

精製蛋白	Δ SpaA			SpaA
SpaA 遺伝子の置換部位	第 642 番目 第 758 番目	第 206 番目 第 461 番目 第 608 番目	第 833 番目	第 642 番目 第 758 番目
蛋白濃度 (mg/ml)	2.30	1.91	2.33	2.28
希釈倍数	生存数/攻撃数	生存数/攻撃数	生存数/攻撃数	生存数/攻撃数
625	10/10	10/10	10/10	10/10
3125	9/10	8/10	10/10	10/10
15625	5/10	0/10	4/10	6/10
78125	0/10	0/10	0/10	0/10
マウス半数防御量 (μ g)	0.0864	0.1885	0.0875	0.0621

【産業上の利用可能性】

【0039】

本発明の方法は、大腸菌で可溶性のSpaA（又は Δ SpaA）を不溶性の封入体として生産する方法を提供するもので、本発明の方法を可溶性蛋白の製造工程に取り入れるることにより、実用的なレベルでのSpaA（又は Δ SpaA）の製造方法の確立を可能にし、当該製造方法が確立されることによってSpaA（又は Δ SpaA）の市場への安定供給が確保される。本発明の方法により得られる組換えSpaA（又は Δ SpaA）蛋白は、本来の可溶性蛋白と同等の免疫原性を保持しており、単独で又は種々の安定剤、保護剤、防腐剤等の添加物と共に用いることにより、豚丹毒ワクチンの材料として利用できる。また、モノクローナル・ポリクローナル抗体を作製する際の抗原として、あるいは、抗SpaA（又は Δ SpaA）蛋白抗体と豚丹毒菌との結合に関する研究材料として利用できる。このように、本願発明の方法により得られるSpaA（又は Δ SpaA）蛋白は、医療及び研究分野において多大なる貢献をするものである。

【図面の簡単な説明】

【0040】

【図 1】 SpaA及び Δ SpaA蛋白発現ベクターを示す図面である。a；豚丹毒菌SE-9株由来のSpaAをコードする遺伝子が挿入されたプラスミド（pET11d/SpaA）、b； Δ SpaA蛋白をコードする遺伝子が挿入されたプラスミド（pET11d/ Δ SpaA）


【図 2】 豚丹毒菌SE-9株由来のSpaA及び Δ SpaA蛋白のSDS-PAGEの結果を示す写真である。M；マーカー、レーン 1；外来蛋白非発現大腸菌培養菌液、レーン 2；SpaA蛋白発現大腸菌培養菌液、レーン 3； Δ SpaA蛋白発現大腸菌培養菌液

【図 3】 豚丹毒菌SE-9株由来の可溶性及び不溶性（封入体） Δ SpaA蛋白のSDS-PAGEの結果を示す写真である。M；マーカー、レーン 1；可溶性 Δ SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心上清、レーン 2；可溶性 Δ SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心沈渣、レーン 3；不溶性 Δ SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心上清、レーン 4；不溶性 Δ SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心沈渣

【図 4】 配列番号 7 の塩基配列との比較により、不溶性（封入体） Δ SpaA蛋白を発現する大腸菌形質転換体（3 クローン：No 1、No 2 及び No 3）より抽出したプラスミドのSpaA遺伝子に認められた変異部位及び制限酵素切断部位を示す図面である。

【図 5】 豚丹毒菌SE-9株由来の可溶性及び不溶性（封入体）SpaA蛋白のSDS-PAGEの結果を示す写真である。M；マーカー、レーン 1；可溶性SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心上清、レーン 2；可溶性SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心沈渣、レーン 3；不溶性SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心上清、レーン 4；不溶性SpaA蛋白発現大腸菌超音波処理液遠心沈渣

【図 6】 精製後の豚丹毒菌SE-9株由来の不溶性（封入体）SpaA及び Δ SpaA蛋白のSDS-PAGEの結果を示す写真である。M；マーカー、レーン 1；SpaA蛋白、レーン 2； Δ Sp



aA蛋白

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> JURIDICAL FOUNDATION THE CHEMO-SERO-THERAPEUTIC RESEARCH INSTITUTE

<120> A method for the production of *Erysipelothrix rhusiopathiae* surface protective antigen in *Escherichia coli*

<130> 2003TE1127

<160> 7

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 1881

<212> DNA

<213> *Erysipelothrix rhusiopathiae*

<400> 1

```
atgaaaaaga aaaaacacct atttccgaaa gtaagtctta tgtcgtgctt acttttaaca      60
gcaatgccac tacaaacagc ttttctgat tcgacagata tttctgtgat tccactaatc      120
ggtgaacaag ttggattgct cccagtttta cctgggacag gggtagatgc tcaggaatac      180
aacaaaatga ctgatgctta tattgaaaaa ttggtatctc taattaatca aaaagtgaag      240
ccgtttctta taaatgagcc aaaggggtac caaagtttcg aagcagtga tgaagagatt      300
aactcgattg taagtgaact taaaaatgaa ggaatgagtc ttcaaaacat tcaccatatg      360
tttaaacaaa gcatccaaaa cctagcaact agaatcggct acagaagttt tatgcaggat      420
gctatgtatc ttgaaaattt tgaaagatta acgattcctg aacttgatga agcatacggt      480
gatttactcg tgaattacga ggtgaaacac cgtatttttag taaaatatga aggtaaagtt      540
aaaggtagag ctcccttaga agcatttata gttcctctaa gagatagaat tcgtagtatg      600
aatgaaattg ctgcagaagt aaattattta cctgaagcgc atgaggattt cttagtttca      660
gattcaagcg agtataatga caaactaaat aatatcaact ttgctttggg tctaggggtc      720
agcgagttta ttgactataa ccggctcgaa aatatgatgg aaaaagaact tcatccactg      780
tatcttgaac tttatgctat gcggagaaat cgccaaattc aagttgtaag agatgtatat      840
ccaaacttgg aacgtgcgaa cgcggttggt gaatccttaa agacaattaa agatataaaa      900
```

caaagaggga agaaactaca ggaacttctt gaaatttata tccaaagaag tggagatgtt 960
 cgaaaaccag atgtactcca acgattttatt ggaaaatatac aatcagtagt tgatgaagaa 1020
 aaaaataaac ttcaagatta tttagaatca gatatttttg attcatatag tgtggatggc 1080
 gagaaaataa gaaataaaga aattacactc atcaatagag atgcatactt atctatgatt 1140
 tacagagctc aatcgatttc ggaaattaag acgattcgtg cagattttaga atcacttgtc 1200
 aaatcattcc aaaatgaaga aagtgactct aaagtagagc ctgaaagtcc cgtaaagta 1260
 gaaaaaccag ttgatgaaga aaaacctaaa gatcaaaaga agctagttga tcaatcaaaa 1320
 cccgaatcga attcaaaaga aggggtggatt aagaaagata ataagtgggt ctatattgag 1380
 aaatcaggtg gaatggcaac aggttgggaag aaggtagcag acaaattggta ctacctgat 1440
 aatacgggtg ctatagttac gggttgggaag aaggtagcaa acaaattggta ctatcttgaa 1500
 aaatcaggtg cgatggcaac aggatgggaag aaagtatcaa acaagtggta ctaccttgaa 1560
 aactcaggtg caatggcaac aggatgggaag aaagtatcaa acaagtggta ctaccttgaa 1620
 aattcaggcg caatggctac aggatggaaa aaggtagcaa acaaattggta ctaccttgaa 1680
 aactcaggtg cgatggcaac aggatgggaag aaagtatcga acaagtggta ctaccttgaa 1740
 aactcaggcg caatggctac aggatggaaa aaggtagcaa acaaattggta ctaccttgat 1800
 aaatcaggaa tgatgggttac aggttcaaaa tctattgatg gtaaaaagta tgcatttaag 1860
 aacgatggaa gttttaaata g 1881

<210> 2

<211> 626

<212> PRT

<213> Erysipelothrix rhusiopathiae

<400> 2

Met Lys Lys Lys Lys His Leu Phe Pro Lys Val Ser Leu Met Ser Cys
 1 5 10 15

Leu Leu Leu Thr Ala Met Pro Leu Gln Thr Ala Phe Ala Asp Ser Thr
 20 25 30

Asp Ile Ser Val Ile Pro Leu Ile Gly Glu Gln Val Gly Leu Leu Pro
35 40 45

Val Leu Pro Gly Thr Gly Val His Ala Gln Glu Tyr Asn Lys Met Thr
50 55 60

Asp Ala Tyr Ile Glu Lys Leu Val Ser Leu Ile Asn Gln Lys Val Lys
65 70 75 80

Pro Phe Leu Ile Asn Glu Pro Lys Gly Tyr Gln Ser Phe Glu Ala Val
85 90 95

Asn Glu Glu Ile Asn Ser Ile Val Ser Glu Leu Lys Asn Glu Gly Met
100 105 110

Ser Leu Gln Asn Ile His His Met Phe Lys Gln Ser Ile Gln Asn Leu
115 120 125

Ala Thr Arg Ile Gly Tyr Arg Ser Phe Met Gln Asp Ala Met Tyr Leu
130 135 140

Glu Asn Phe Glu Arg Leu Thr Ile Pro Glu Leu Asp Glu Ala Tyr Val
145 150 155 160

Asp Leu Leu Val Asn Tyr Glu Val Lys His Arg Ile Leu Val Lys Tyr
165 170 175

Glu Gly Lys Val Lys Gly Arg Ala Pro Leu Glu Ala Phe Ile Val Pro
180 185 190

Leu Arg Asp Arg Ile Arg Ser Met Asn Glu Ile Ala Ala Glu Val Asn
195 200 205

Tyr Leu Pro Glu Ala His Glu Asp Phe Leu Val Ser Asp Ser Ser Glu
210 215 220

Tyr Asn Asp Lys Leu Asn Asn Ile Asn Phe Ala Leu Gly Leu Gly Val
225 230 235 240

Ser Glu Phe Ile Asp Tyr Asn Arg Leu Glu Asn Met Met Glu Lys Glu
245 250 255

Leu His Pro Leu Tyr Leu Glu Leu Tyr Ala Met Arg Arg Asn Arg Gln
260 265 270

Ile Gln Val Val Arg Asp Val Tyr Pro Asn Leu Glu Arg Ala Asn Ala
275 280 285

Val Val Glu Ser Leu Lys Thr Ile Lys Asp Ile Lys Gln Arg Gly Lys
290 295 300

Lys Leu Gln Glu Leu Leu Glu Ile Tyr Ile Gln Arg Ser Gly Asp Val
305 310 315 320

Arg Lys Pro Asp Val Leu Gln Arg Phe Ile Gly Lys Tyr Gln Ser Val
325 330 335

Val Asp Glu Glu Lys Asn Lys Leu Gln Asp Tyr Leu Glu Ser Asp Ile
340 345 350

Phe Asp Ser Tyr Ser Val Asp Gly Glu Lys Ile Arg Asn Lys Glu Ile
355 360 365

Thr Leu Ile Asn Arg Asp Ala Tyr Leu Ser Met Ile Tyr Arg Ala Gln
370 375 380

Ser Ile Ser Glu Ile Lys Thr Ile Arg Ala Asp Leu Glu Ser Leu Val
385 390 395 400

Lys Ser Phe Gln Asn Glu Glu Ser Asp Ser Lys Val Glu Pro Glu Ser
405 410 415

Pro Val Lys Val Glu Lys Pro Val Asp Glu Glu Lys Pro Lys Asp Gln
420 425 430

Lys Lys Leu Val Asp Gln Ser Lys Pro Glu Ser Asn Ser Lys Glu Gly
435 440 445

Trp Ile Lys Lys Asp Asn Lys Trp Phe Tyr Ile Glu Lys Ser Gly Gly
450 455 460

Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val Ala Asp Lys Trp Tyr Tyr Leu Asp
465 470 475 480

Asn Thr Gly Ala Ile Val Thr Gly Trp Lys Lys Val Ala Asn Lys Trp
485 490 495

Tyr Tyr Leu Glu Lys Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val
500 505 510

Ser Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Glu Asn Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly
515 520 525

Trp Lys Lys Val Ser Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Glu Asn Ser Gly Ala
530 535 540

Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val Ala Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Glu
545 550 555 560

Asn Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val Ser Asn Lys Trp
565 570 575

Tyr Tyr Leu Glu Asn Ser Gly Ala Met Ala Thr Gly Trp Lys Lys Val
580 585 590

Ala Asn Lys Trp Tyr Tyr Leu Asp Lys Ser Gly Met Met Val Thr Gly
595 600 605

Ser Lys Ser Ile Asp Gly Lys Lys Tyr Ala Phe Lys Asn Asp Gly Ser
610 615 620

Leu Lys
625

- <210> 3
<211> 37
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> Sense primer designed for preparation of SpaA and SpaA protein
by PCR amplification
- <400> 3
catgccatgg ctttcgctga ttcgacagat atttctg 37
- <210> 4
<211> 33
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> Antisense primer designed for preparation of SpaA protein by PC
R amplification
- <400> 4
cgcgcatcct tatactttaa cgggactttc agg 33
- <210> 5
<211> 38
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> Antisense primer designed for preparation of SpaA protein by PCR
amplification
- <400> 5
cgcgcatccc tctatitttaa acttccatcg ttcttaaa 38
- <210> 6
<211> 24
<212> DNA
<213> Artificial
- <220>
<223> Oligonucleotide designed for preparation of pointmutated SpaA pro
tein by site directed mutagenesis

<400> 6
ctgaagcgca ggaggatttc ttag

24

<210> 7
<211> 1228
<212> DNA
<213> Erysipelothrix rhusiopathiae

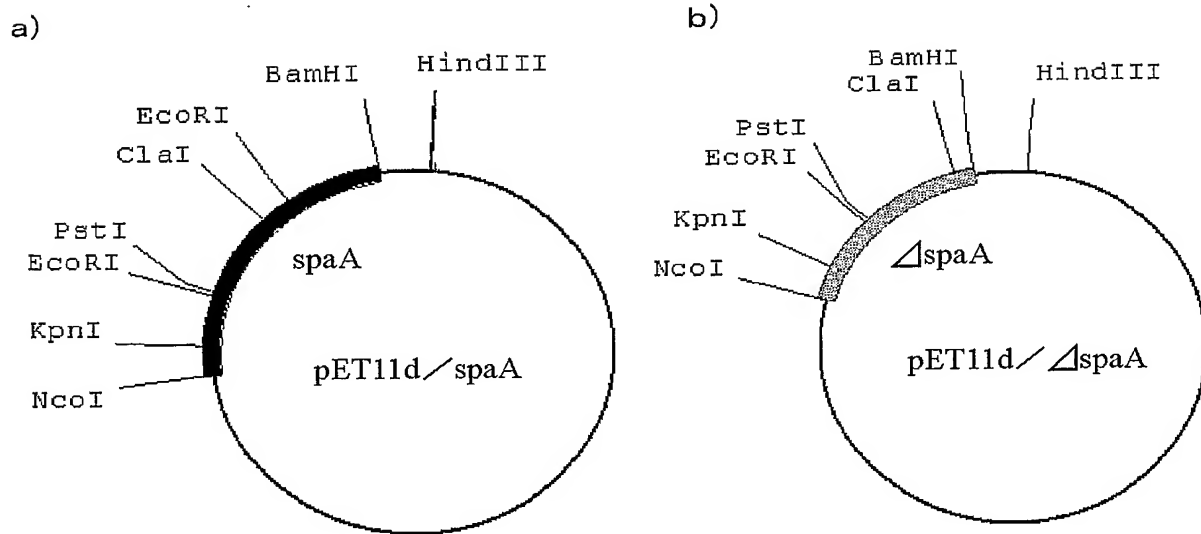
<400> 7
tgattccact aatcggtgaa caagttggat tgctcccagt tttacctggg acagggatac 60
atgctcagga atacaacaaa atgactgatg cttatatatga aaatttggtg tctctaatta 120
atcaaaaagt gaagccgttt cttataaatg aaccaaaggg gtaccaaagt ttcgaagcag 180
tgaatgaaga gattaactcg attgtaagtg aacttaaaca tgaaggaatg agtcttcaaa 240
acattcacca tatgttttaa caaagcatcc aaaacctagc aactagaatc ggctacagaa 300
gttttatgca ggatgctatg tatcttgaaa attttgaaag attaacgatt cctgaacttg 360
atgaagcata cgttgattta ctctgtgaatt acgaggtgaa acaccgtatt ttagtaaaat 420
atgaagataa agttaaggt agagctccat tagaagcatt tatagttcct ctaagaaata 480
gaattcgtag tatgaatgaa attgctgcag aagtaaatta tttacctgaa gcgcatgagg 540
atttcttagt ttcagattca agcgagtata atgacaaact aaataatatc aactttgctt 600
tgggtctagg ggtcagcgag tttattgact ataaccggct cgaaaatatg atggaaaaag 660
aaattcatcc attgtatctt gaactttatg ctatgcggag aaatcgccaa attcaagttg 720
taagagatgt atatccaaac ttggaacgtg cgaacgcggt tgttgaatcc ttaaagacaa 780
ttaaagatat aaaacaaaga gagaagaaac tacaggaact tcttgaaatt tatatccaaa 840
gaagtggaga tggtcgaaaa ccagatgtac tccaacgatt tattggaaaa tatcaatcag 900
tagttgatga agaaaaaaat aaacttcaag attattttaga atcagatatt tttgattcat 960
atagtgtgga tggcgagaaa ataagaaata aagaaattac actcatcaat agagatgcat 1020
acttatctat gatttacaga gctcaatcga tttcggaaat taagacgatt cgtgcagatt 1080
tagaatcact tgtcaaatca ttccaaaatg aagaaagtga ttctaaagta gagcctgaaa 1140
gtcccggttaa agtagaaaaa ccagttgata aagaaaaacc taaagatcaa aagaagccag 1200

ttgatcaatc aaaacccgaa tcgaattc

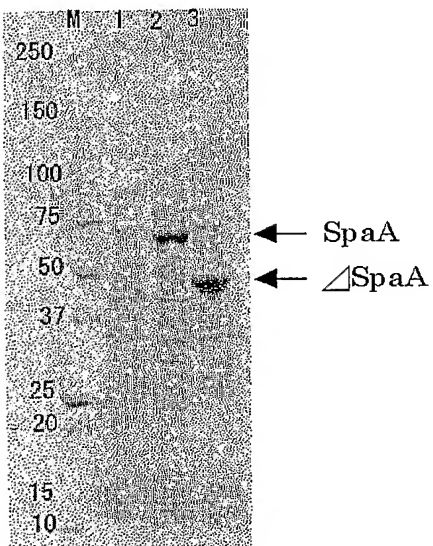
1228

【書類名】 図面

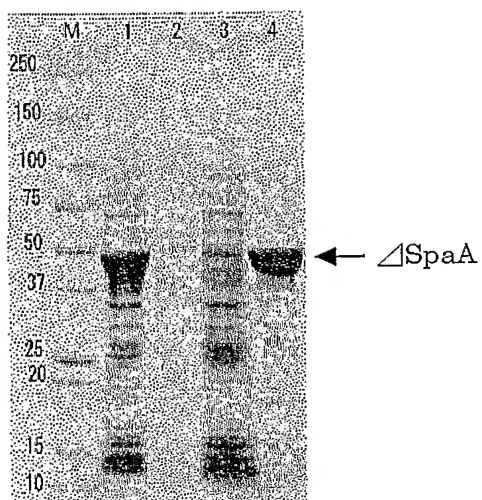
【図 1】



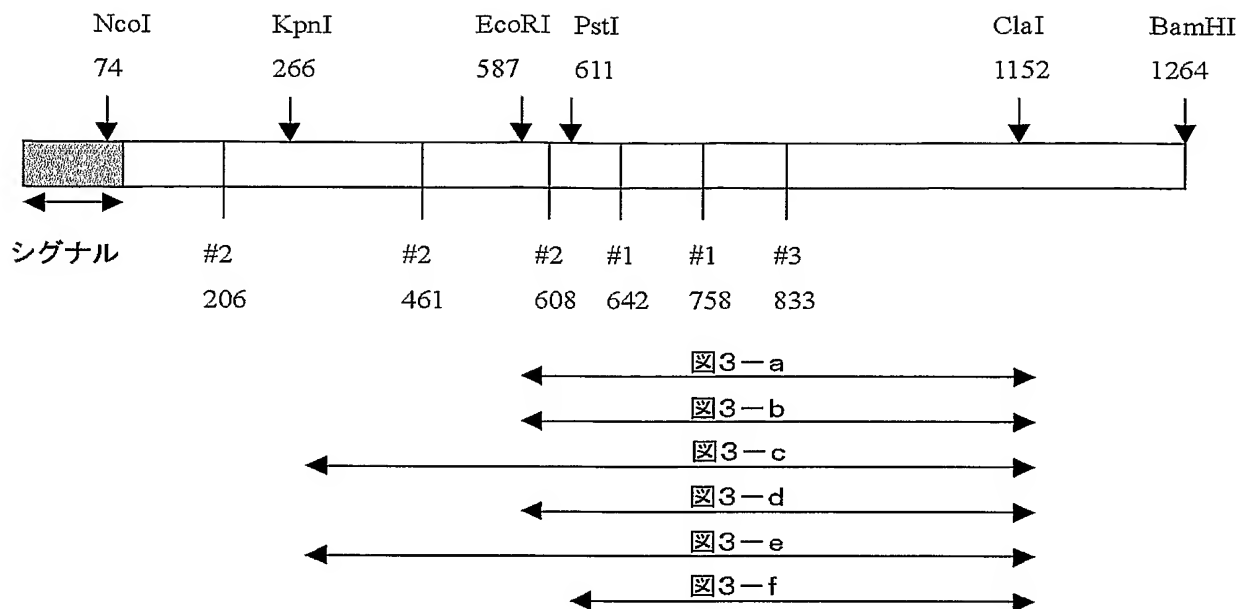
【図 2】



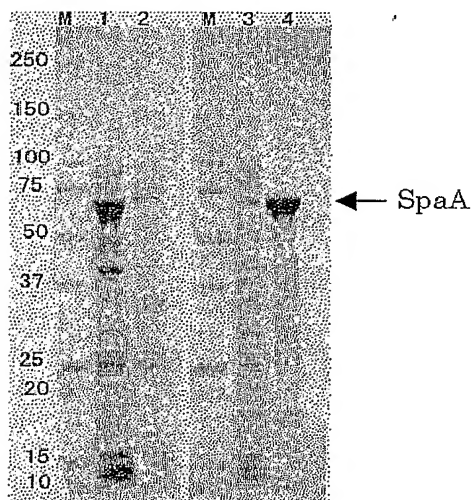
【図 3】



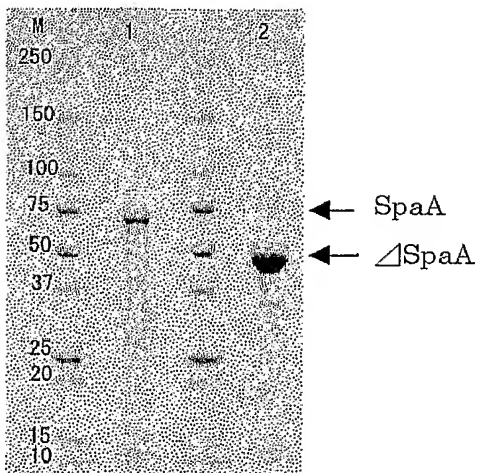
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 大腸菌内で封入体を形成する豚丹毒菌表層防御抗原SpaA蛋白、その短縮形 Δ SpaA蛋白及びその生産方法を提供する。

【解決手段】 下記(1)～(6)の何れか一つのアミノ酸又は二つ以上の組合せからなるアミノ酸置換を有するSpaA(又は Δ SpaA)蛋白をコードする遺伝子、当該遺伝子を有する発現ベクターで大腸菌を形質転換してSpaA(又は Δ SpaA)蛋白を封入体として発現させる方法、この方法を取り入れたSpaA(又は Δ SpaA)蛋白の製造方法、及び当該製造方法により得られる組換えSpaA(又は Δ SpaA)蛋白。

- (1) 第69番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (2) 第154番目のアミノ酸をグリシンに置換
- (3) 第203番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- (4) 第214番目のアミノ酸をグルタミンに置換
- (5) 第253番目のアミノ酸をトレオニンに置換
- (6) 第278番目のアミノ酸をグリシンに置換

【選択図】 なし

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2 0 0 4 - 0 5 3 8 8 2
受付番号	5 0 4 0 0 3 2 3 4 4 5
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0 0 9 4
作成日	平成 1 6 年 3 月 1 日

< 認定情報・付加情報 >

【提出日】 平成16年 2月27日

特願 2 0 0 4 - 0 5 3 8 8 2

ページ : 1/E

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[0 0 0 1 7 3 5 5 5]

1. 変更年月日

1 9 9 6 年 3 月 4 日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所